

Title	Characterization of Pkn2, a Transmembrane Protein Serine/Threonine Kinase of Myxococcus xanthus.
Author(s)	有働, 洋
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40476
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について /a> をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	有 働 洋
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 2 5 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 9 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Characterization of Pkn2, a Transmembrane Protein Serine/Threonine Kinase of <i>Myxococcus xanthus</i> . (<i>Myxococcus xanthus</i> 由来膜貫通型蛋白質セリン/スレオニン磷酸化酵素Pkn2の解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 崎 山 文 夫 (副査) 教 授 谷 澤 克 行 教 授 田 嶋 正 二

論 文 内 容 の 要 旨

ミキソバクテリアの一種である *Myxococcus xanthus* は、グラム陰性の土壌細菌で、集団を形成して行動し、捕食や子実体形成を行う。*M. xanthus* は、多数の細胞外シグナルを必要とし、細胞応答に関与する情報伝達系の解析の上で興味を持たれてきた。私は、*M. xanthus* から膜貫通型の蛋白質セリン/スレオニン磷酸化酵素Pkn2を同定し、その機能について考察した。

Pkn2は、830 アミノ酸残基からなる87kDa の蛋白質で、真核生物の蛋白質磷酸化酵素に保存されている11個全てのサブドメインを有する。Pkn2の活性ドメインは、Pkn1, Ca²⁺/カルモジュリン依存性蛋白質磷酸化酵素、ロドプシン磷酸化酵素のものとそれぞれ31, 27, 25%の相同性を示した。Pkn2を大腸菌で発現させるとSDS-PAGEで110kDaの位置に検出され、無機磷酸³²Pで標識すると自己磷酸化活性によってセリンとスレオニン残基が磷酸化されていた。また、Pkn2は18残基からなる疎水領域を含んでいるが、これが実際に膜貫通領域として機能し、活性ドメインを原形質内に有する受容体型の酵素であることを検証した。このことから、Pkn2は、原核生物において初めての膜貫通型蛋白質セリン/スレオニン磷酸化酵素であることが示された。また、これらの実験の過程で、Pkn2が大腸菌由来のβ-ラクタマーゼを磷酸化することを発見した。Pkn2はβ-ラクタマーゼのスレオニン残基を磷酸化することにより前駆体の膜透過を阻害し、蛋白質の磷酸化が膜透過にも影響を与え得ることが始めて示された。

大腸菌を利用して大量発現されたPkn2を精製し、その自己磷酸化活性を指標としてPkn2の生化学的な研究を行った。精製されたPkn2は、ATP に対するKm値が177 μM, Vmax値が73nmol/min/mg の自己磷酸化活性を保持し、Pkn2の至適条件は一般的な真核生物型蛋白質磷酸化酵素のものとよく一致した。また、蛋白質磷酸化酵素の阻害剤を用いた実験からPkn2がセリン/スレオニン磷酸化酵素であることを裏付けた。また、Mn²⁺は顕著に磷酸化活性を促進し、Pkn2がよりMn²⁺に依存性であることがわかった。

Pkn2の *M. xanthus* における生物学的な機能を調べるために、*pkn2*欠損株と大量発現株を作製した。両株とも、通常の増殖において顕著な変化は認められないが、発生段階において違いが観察された。*pkn2*欠損株は、野生株に比べて早く子実体形成を開始したが、野生株の40%程度しか胞子を形成しなかった。一方、大量発現株では、欠損株とは対照的にかなり遅れた子実体形成を示し、胞子産生量も減少した。これから、Pkn2は、子実体形成にたいして抑制的に作用すると共に、胞子形成の調節も行うことが示された。また、Pkn2の発現時期と発現量を調査したところ、対数増殖後期において低度産生される。Pkn2は、増殖段階から後戻りのさかない子実体形成に入る指標を与え、

子実体形成と孢子形成に関与すると考えられる。

Pkn2の磷酸化基質を同定するために、新たな手法を用いた磷酸化基質の検索を試みた。*pkn2*遺伝子が大腸菌において誘導すると、大腸菌のコロニー形成が阻害される。これは、Pkn2が大腸菌の或る蛋白質を磷酸化して、その機能を障害したため生育阻害が起きたものと示唆された。そこで、大腸菌染色体DNA ライブラリーを作製して抑制遺伝子の解析を行ったところ、それが染色体凝集や遺伝子組み換えに関与しているヒストン様DNA 結合蛋白質(HU α)の遺伝子*hupA*であることがわかった。HU α を部分精製しPkn2と反応させると、スレオニン残基が効果的に磷酸化され、この系が磷酸化酵素基質の検索法として利用できることがわかった。現在、HU α の機能に対する磷酸化の影響と*M.xanthus*におけるHU α の有無を検討中である。

以上の実験を通して、原核生物で初めて発見された膜貫通型の蛋白質セリン/スレオニン磷酸化酵素Pkn2は、*M.xanthus*において何らかの細胞外シグナルを受容し、基質蛋白質の磷酸化による蛋白質機能の修飾または遺伝子発現の調節により子実体形成や孢子形成に関与するものと推察される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、粘菌と生活環が類似するミキソバクテリアの情報伝達系の解明を目指して行なったもので、それに関与する蛋白質セリン/スレオニン磷酸化酵素Pkn2の構造、酵素的性質、生物学的機能を明らかにした。原核生物由来の本酵素に関する知見は貴重であり、本論文は、博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。